

水杨醛缩芳胺席夫碱铜(II)配合物抑制蛋白酪氨酸磷酸酶活性研究

袁彩霞 兰淑芬 卢丽萍*

(山西大学分子科学研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006)

摘要: 为了探讨席夫碱配体上取代基变化对其配合物抑制蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTPs)活性的影响, 合成表征了水杨醛缩芳胺席夫碱铜(II)配合物 $[\text{Cu}(\text{X-pimp})_2]$ ($\text{X}=\text{Cl}, \text{Br}$ 和 Acetyl), 用紫外光谱滴定和 pH 电位滴定研究了 $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$ 的溶液结构, 并测定了 3 个配合物抑制 4 种 PTPs 活性的 IC_{50} 值。结果表明它们都能够有效抑制 PTP1B 和 TCPTP ($0.20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} < \text{IC}_{50} < 0.31 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 但对 SHP-1 的抑制较弱且对 SHP-2 几乎无抑制作用。分析与文献结果比较发现, 席夫碱配体上苯胺对位取代基类型的改变不会显著影响其抑制作用, 但取代基位置的改变可能会影响其选择性。稳态动力学研究表明 $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$ 能够非竞争性抑制 PTP1B 活性, 而荧光光谱实验表明二者形成了键合常数为 $9.3 \times 10^6 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ 的 1:1 复合物。我们推测, 配合物可能结合在 PTP1B 非活性区域, 间接导致活性中心结构变化, 从而抑制其活性。

关键词: 席夫碱; 铜(II)配合物; 蛋白酪氨酸磷酸酶; 抑制剂; 取代基效应

中图分类号: O614.121; Q556+.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2015)05-0915-08

DOI: 10.11862/CJIC.2015.127

Evaluation of Cu(II) Complexes with Schiff Base of Salicylanilide as the Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases

YUAN Cai-Xia LAN Shu-Fen LU Li-Ping*

(Institute of Molecular Science, the Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Education Ministry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: To improve the inhibitory selectivity and explore the substitution effect of the Schiff base ligands on the inhibitory effect of the complex against the PTPs, three Cu(II) complexes, $[\text{Cu}(\text{X-pimp})_2]$ ($\text{X-pimp}=2-((4-\text{X-phenylimino})\text{methyl})\text{phenol}$, $\text{X}=\text{Cl}, \text{Br}$, and Acetyl), were prepared and characterized by X-ray, EA, IR, UV-Vis and ESI-MS. Taking $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$ complex as an example, the solution species distribution with different pH values and the main existing form under the pH neutral condition were investigated using both the pH potentiometric and UV titrations, indicating that the ration of Cl-pimp ligand and Cu(II) ion in the complex was 2:1 in an aqueous solution and $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2\text{H}_2\text{L}]^-$ is the main existing form in the pH neutral condition. Then the inhibitory activities of these complexes against above-mentioned protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), T-cell protein tyrosine phosphatase(TCPTP), Src homology phosphatase 1 (SHP-1), and Src homology phosphates 2 (SHP-2) was evaluated using IC_{50} values. The results revealed that these three complexes showed similar inhibitory behaviours, i.e. potent effect against PTP1B and TCPTP ($0.20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} < \text{IC}_{50} < 0.31 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), the relatively lower effect against SHP-1 ($2.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} < \text{IC}_{50} < 4.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), while negligible effect against SHP-2 ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), which indicated that the type of substituents on the para position of phenylimino of the Schiff base ligand did not influence the inhibitory effect of the complexes against PTPs obviously. However, comparing the current results to

收稿日期: 2014-11-17。收修改稿日期: 2015-01-27。

国家自然科学基金(No.21001070, 21171109, 21471092), 高等学校博士学科点专项科研基金(No.20121401110005), 山西省自然科学基金(No.2011021006-2)和山西省回国留学人员科研项目(No.2012-004)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: luliping@sxu.edu.cn

that of the above-mentioned previous work, we can find that the change in the position of the substituents may change the selectivity of inhibitory effect of the complexes against PTPs. The interactions between the complexes and PTPs were studied using $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$ and PTP1B as the representatives. The kinetics assays showed that the complex inhibited PTP1B in a non-competitive mode and the inhibition constant was calculated to be $0.35 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The fluorescence titration revealed that the complex bound to PTP1B with the molar ratio of 1:1 and the binding constant of $9.3 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. We infer that the $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$ complex may bind firmly to inactive area of PTP1B and indirectly lead to the structural changes to the active center, which inhibits the activity of PTP1B.

Key words: Schiff base; Cu(II) complex; protein tyrosine phosphatases; inhibitor; substituent effect

蛋白酪氨酸磷酸酶(PTPs)是生物体内广泛存在的一类不含金属的酶,与蛋白酪氨酸激酶(PTKs)共同调控细胞内酪氨酸的磷酸化水平,该磷酸化水平的正常维持在生物体内细胞信号转导和调节过程中发挥着重要作用^[1-2]。PTPs 催化活性失常能够引起酪氨酸磷酸化水平的异常,这种异常与糖尿病、肥胖、癌症和免疫性缺陷等多种人类疾病的发生和发展密切相关^[3],其中有些 PTP,如 PTP1B 和 TCPTP 等,已经成为目前公认的抗糖尿病及抗癌药物研制的作用靶点^[4],所以寻找和开发针对某种或某几种 PTP 酶的高效特异性抑制剂成为近年来该领域研究的热点。

目前国内外主要以有机小分子或天然产物作为 PTPs 酶活性的抑制剂^[5],而以过渡金属配合物为抑制剂的研究相对较少,且主要集中于钒及其配合物^[6-7]。然而,在人体内,铜的含量及其对生命的重要性都远远高于钒,而且越来越多的研究也表明一些铜配合物具有较好的降血糖和抗肿瘤效果^[8-13]。考虑到 PTPs 与糖尿病和肿瘤的发生发展都有密切关系,但目前关于铜配合物与 PTPs 相互作用的研究却非常少,我们课题组以 PTPs 为作用目标,开展了基于铜(II)配合物的抑制剂研究^[14-19]。结果发现铜(II)配合物结构的变化会影响其对各种 PTPs 活性抑制的强度和选择性。但是相关工作在数量上仍然非常少,还不能给出铜配合物结构与其 PTPs 活性抑制作用之间构效关系的定性结论,因此我们需要开展更多关于铜配合物的结构及其与 PTPs 之间相互作用模式及作用机理的研究。

我们课题组近期的研究表明,5-氯水杨醛缩苯胺席夫碱铜(II)配合物 $[\text{Cu}(\text{cpmp})_2]$ (cpmp=4-chloro-2-((phenylimino)methyl)phenol)(见图 1)对 PTP1B、TCPTP 和 SHP-1 活性都有较好的抑制作用^[20],但是这种抑制缺乏选择性,那么能否通过对配体结构的

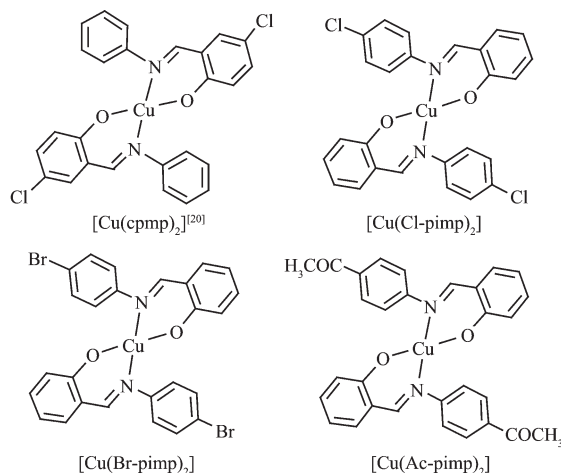


图 1 水杨醛缩 4-取代苯胺席夫碱衍生物铜(II)配合物的结构

Fig.1 Structures of Cu(II) complexes with Schiff base of salicylanilide derivatives

修饰使席夫碱铜(II)配合物对一种或者一类酶活性的抑制有选择性呢?为此在本文中我们合成了另一类水杨醛缩芳胺衍生物席夫碱铜(II)配合物(见图 1),两类配合物的主要区别是取代基的位置不同,我们发现这种位置的变化使配合物对 SHP-1 活性的抑制能力显著降低,但没有明显改变配合物对 PTP1B 和 TCPTP 这两种同源性很高的酶活性的抑制能力,从而使配合物对 PTPs 酶活性的抑制作用具有了一定的选择性。该结果表明,改变配体上取代基的位置可能是设计高效和特异性 PTP 金属配合物抑制剂的一种可行方法。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

4 种 PTPs(PTP1B、TCPTP、SHP-1 和 SHP-2)酶由课题组按照文献表达纯化获得^[21-26],其中酶的重组表达质粒菌株由吉林大学生命科学院 Edmond H.

Fischer 信号传导实验室付学奇教授提供。其它试剂均为市售分析纯,未经处理直接使用,实验用水均为三次蒸馏水。配体 Cl-pimp 按照文献方法合成^[27]。

实验过程中使用的仪器有:VARI-EL 型微量元素分析仪,Shimadzu-FTIR-8300 型傅里叶红外光谱仪,Bruker SMART APEX 1K CCD 衍射仪,Hewlett-Packard-8453 型紫外光谱仪,Cary Eclipse 型荧光光谱仪,Quattro Micro API 型电喷雾质谱仪,Spectra Max 190 型全自动酶标仪,PHS-3TC 型 pH 计(带有复合玻璃电极)。

1.2 电位滴定分析

用 pH 电位滴定法测定了配合物[Cu(Cl-pimp)₂]在水溶液中的稳定常数及其物种分布情况^[28]。各个常数的测定实验均在 25.0 °C,NaCl 溶液的离子强度为 0.1 mol·L⁻¹ 和高纯氮气保护条件下进行,滴定所用的 NaOH 浓度为 0.094 95 mol·L⁻¹,支持酸 HCl 浓度为 0.112 4 mol·L⁻¹,配体浓度为 2 mmol·L⁻¹,滴定前配体用 2 倍的盐酸酸化,其酸解离常数及配合物稳定常数均使用 SUPERQUAD 程序计算^[29]。由于配体较差的水溶性,滴定实验采用含 20% 甲醇的水溶液,溶液的离子强度通过文献方法校正(即 $pK_{MW} = -\lg(C_H \cdot C_A^-) = -14.10$)^[30-31],其中 $C_A = C_{OH} + C_{CH_3O^-}$ 。配合物的稳定常数 $\beta_{pqr} = C_{M,L,H}^{2q-p+r} / (C_M^p \times C_L^q \times C_H^r)$,其中 p, q, r 代表相关物种的化学计量数,当 r 为正值时公式中 H 表示氢离子,为负值时表示氢氧根离子,M 表示铜离子,L 表示配体。

1.3 紫外-可见光谱滴定实验

运用紫外-可见光谱滴定实验测定了在 pH 值为 7.2 的 MOPS 缓冲溶液中铜离子对配体的滴定曲线,通过滴定曲线分析出铜离子与配体在缓冲溶液中的结合比,由于配合物在水溶液中较低的溶解度,紫外实验都在含 10% DMSO 的 MOPS 缓冲溶液中进行,在 200~800 nm 范围内扫描电子吸收光谱图。

1.4 Job's plot 曲线测定实验

用含 10% DMSO 的 MOPS 缓冲溶液配制一系列不同物质的量之比的溶液,即铜离子浓度与铜离子和配体总浓度比分别为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 和 1.0,在 200~800 nm 范围内扫描其电子吸收光谱。

1.5 蛋白酪氨酸磷酸酶活性抑制实验

配合物抑制 PTPs 活性实验以对硝基苯磷酸二

钠盐(pNPP)为反应底物^[22],在 37 °C, pH 为 7.2 的 MOPS 缓冲体系中进行。首先向 96 孔板中依次加入 83 μL 含酶缓冲溶液、10 μL 不同浓度的抑制剂以及 2 μL 启动反应的底物 pNPP(0.1 mol·L⁻¹)和 5 μL (2 mol·L⁻¹)终止反应的 NaOH 溶液,然后用酶标仪测定反应体系中 pNPP 水解产物对硝基苯酚(p-NP)在 405 nm 处的吸收强度,用 origin 程序拟合浓度依赖曲线,求得半数抑制浓度 IC₅₀ 值,所有测定进行 3 次以上平行实验。

用酶促动力学实验研究配合物对 PTP1B 的抑制类型和抑制常数,固定酶浓度,分别选取不同浓度的抑制剂和底物,测定不同抑制剂浓度下,随着底物浓度的增加初始反应速率的变化值,根据 Lineveaver-Bruk 方程分析配合物的抑制类型,并计算抑制常数 K_i 值^[22,32-33]。

荧光光谱滴定实验在 pH=7.2 的 MOPS 缓冲溶液中进行,取 2 mL 0.11 μmol·L⁻¹ 的 PTP1B 溶液加入到 1 cm 的石英比色皿中,在 37 °C 下,设定激发和发射狭缝均为 10 nm,以 280 nm 为激发波长,扫描 PTP1B 溶液的发射峰,待酶溶液的荧光强度稳定后,用 10 μmol·L⁻¹ 的配合物滴定酶溶液,每次滴加 4 μL,吸打均匀,静置 5 min 扫描,依次进行,直到荧光强度不再发生变化,根据如下荧光猝灭方程计算配合物与 PTP1B 的相互作用位点和键合常数^[16,34-36]。

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_A + n \lg C_Q$$

其中 F_0 表示配合物不存在时 PTP1B 的初始荧光强度, F 表示加入配合物之后 PTP1B 的荧光强度, C_Q 为配合物浓度, K_A 为键合常数, n 为结合比。

1.6 配合物的合成及表征

将对位取代的苯胺(1.0 mmol)溶于 10 mL 无水甲醇溶液,搅拌直至完全溶解,向溶液中滴加水杨醛(105 μL, 1.0 mmol)的无水甲醇溶液(5 mL),继续搅拌并回流 1 h,然后加入氯化铜(0.085 g, 0.5 mmol)的水溶液(2 mL),用 KOH 调 pH 值到 7.0,反应溶液继续回流 2 h,溶液冷却过滤,滤液室温放置一段时间,析出目标产物,产物分别用水和甲醇多次洗涤,真空干燥。

[Cu(Cl-pimp)₂] (1): 棕色块状晶体,产率 56%; UV-Vis (DMSO) λ_{max} / nm(ϵ / (10⁻⁴ L·mol⁻¹·cm⁻¹)): 263 (4.20), 282(5.29), 382(2.24); IR(KBr) ν / cm⁻¹: 1 604, 1 522, 1 486, 1 461, 1 381, 1 171; ESI-MS(FW for 1: 524.89) m/z (%), Found: 638.08 (100), 219.08 (70), 364.25 (65),

302.25 (60), 423.33 (35); Calcd. $[\mathbf{1}+5\text{H}_2\text{O}+\text{Na}^+]^+$ for 637.95, $[\mathbf{1}+2\text{CH}_3\text{OH}+3\text{Na}^+]^{3+}$ for 219.31, $[\mathbf{1}+\text{CH}_3\text{OH}+7\text{H}_2\text{O}+2\text{Na}^+]^{2+}$ for 364.50, $[\mathbf{1}+\text{CH}_3\text{OH}+2\text{Na}^+]^{2+}$ for 301.45, $[\mathbf{1}+3\text{CH}_3\text{OH}+10\text{H}_2\text{O}+2\text{Na}^+]^{2+}$ for 423.57。Element analysis(%) Calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{Cu}$: C 59.49, H 3.46, N 5.3; Found: C 59.53, H 3.42, N 5.38。

$[\text{Cu}(\text{Br-pimp})_2]$ (**2**): 棕色固体粉末, 产率为 53%; UV-Vis (DMSO) $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}(\epsilon / (10^{-4} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}))$: 265(3.40), 288(2.95), 390(1.40); IR (KBr) ν / cm^{-1} : 1 609, 1 537, 1 486, 1 468, 1 379, 1 192; ESI-MS (FW for **2**: 613.79) m/z (%), Found: 812.92 (35), 218.92 (100), 368.92 (30)。Calcd. $[\mathbf{2}+\text{CH}_3\text{OH}+8\text{H}_2\text{O}+\text{Na}^+]^+$ for 812.94, $[\mathbf{2}+\text{H}_2\text{O}+\text{Na}^++2\text{H}^+]^{3+}$ for 218.95, $[\mathbf{2}+2\text{CH}_3\text{OH}+2\text{H}_2\text{O}+\text{Na}^++\text{H}^+]^{2+}$ for 368.95。Element analysis(%) Calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{18}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{Cu}$: C 50.88, H 2.96, N 4.56; Found: C 50.78, H 2.92, N 4.54。

$[\text{Cu}(\text{Ac-pimp})_2]$ (**3**): 棕色固体粉末, 产率为 79%。UV-Vis (DMSO) $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}(\epsilon / (10^{-4} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}))$: 261 (3.02), 294(4.47), 390(1.81); IR (KBr) ν / cm^{-1} : 1 674, 1 611, 1 537, 1 440, 1 323, 1 272, 1 182; ESI-MS (FW for **3**: 540.07) m/z , Found: 364.17(100), 249.00(75), 481.25(20)。Calcd. $[\mathbf{3}+4\text{CH}_3\text{OH}+2\text{H}_2\text{O}+\text{Na}^++\text{H}^+]^{2+}$ for 364.13, $[\mathbf{3}+\text{CH}_3\text{OH}+6\text{H}_2\text{O}+3\text{Na}^+]^{3+}$ for 249.72, $[\mathbf{3}+5\text{CH}_3\text{OH}+12\text{H}_2\text{O}+2\text{Na}^+]^{2+}$ for 481.22。Element analysis (%) Calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{Cu}$: C 66.72, H 4.48, N 5.19; Found: C 66.74, H 4.51, N 5.27。

2 结果与讨论

2.1 配合物结构及其表征

元素分析、红外光谱、电喷雾质谱和紫外-可见光谱等的分析结果均表明所合成的铜配合物为目

标配合物(见图 1), 具体表征见实验部分。其中配合物 $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$ 的 X-射线晶体结构分析显示, 配合物为单斜晶系, 属于 $P2_1/c$ 空间群, 晶胞参数为 $a=1.354\ 0(5)\ \text{nm}$, $b=1.064\ 7(4)\ \text{nm}$, $c=0.815\ 9(3)\ \text{nm}$; $\beta=98.993(5)^\circ$, $R_1=0.06$ 。配合物晶体结构图见电子支撑材料(图 S1), 席夫碱配体与铜离子的配位比为 2:1, 其中铜离子的配位构型为反式平面四配位, Cu-O 键的键长为 $0.187\ 8(3)\ \text{nm}$, Cu-N 键的键长为 $0.202\ 4(3)\ \text{nm}$, 该结构与文献报道的结构一致^[27]。

2.2 配合物的溶液结构分析

2.2.1 电位滴定分析

配合物的生物活性与其在溶液中的物种分布形式有关。为了确定配合物在不同 pH 值溶液中的主要存在形式, 我们以 $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$ 为例, 用 pH 电位滴定法测定了配体 Cl-pimp 的解离常数和金属 Cu^{2+} 与该配体形成配合物的稳定常数(如表 1), 并得到该配合物在不同 pH 条件下的滴定曲线(图 S2, 电子支撑材料)和物种分布曲线(如图 2)。由图 2 可知, 在 $\text{pH}=7.0\sim 7.4$ 范围内, 配合物在甲醇水溶液(含 20% 甲醇)中的主要物种有 $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2\text{H}_1]^-$, $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2\text{H}_2]^{2-}$ 和 $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$, 它们占整个物种的 90% 以上, 表明配体与金属铜离子在水溶液中主要形成 2:1 的配合物, 而且在 pH 为 7.2 的溶液中, 配合物的主要活性物种是 $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2\text{H}_1]^-$ 。

2.2.2 紫外-可见光谱滴定分析

由于配合物的活性实验均在 MOPS 缓冲溶液(含有 10% DMSO, $\text{pH}=7.2$)中进行, 所以我们又使用紫外-可见光谱滴定法对铜离子和配体在该溶液中的结合方式进行分析。仍然以 $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$ 为例, 先将配体溶于 MOPS 缓冲溶液($0.02\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 然后用 $0.8\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的铜离子滴定配体, 每次滴加

表 1 $\text{Cu}^{2+}/\text{Cl-pimp}$ 体系中配体的化学计量数, 配体解离常数 $\text{p}K_a$ 和配合物稳定常数 $\lg\beta$ 值

Table 1 Stoichiometry, notation, $\text{p}K_a$ of the ligand and $\lg\beta$ of complex species in the $\text{Cu}^{2+}/\text{Cl-pimp}$ system

$P_{M^{2+}}$	$q_{(\text{Cl-pimp})^{-1}}$	r_{H^+}	Species	$\text{p}K_a$ or $\lg\beta_{\text{pqr}}$
0	1	1	$[\text{H}(\text{Cl-pimp})]$	8.32(7)
0	1	2	$[\text{H}_2(\text{Cl-pimp})]^+$	12.22(8)
1	2	3	$[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2\text{H}_3]^{3+}$	28.01(9)
1	2	1	$[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2\text{H}]^+$	19.21(4)
1	2	0	$[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$	13.55(2)
1	2	-1	$[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2\text{H}_1]^-$	7.18(2)
1	2	-2	$[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2\text{H}_2]^{2-}$	-0.81(2)
1	2	-3	$[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2\text{H}_3]^{3-}$	-10.02(2)
1	2	-4	$[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2\text{H}_4]^{4-}$	-19.63(2)

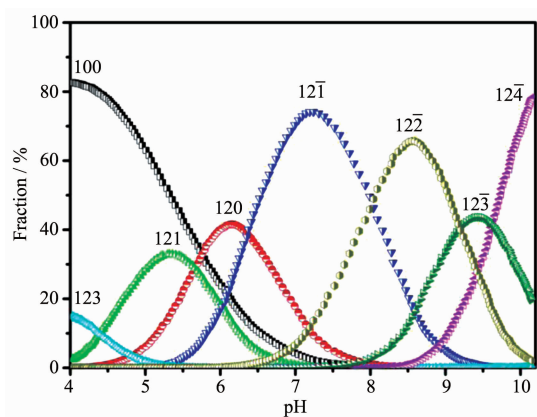
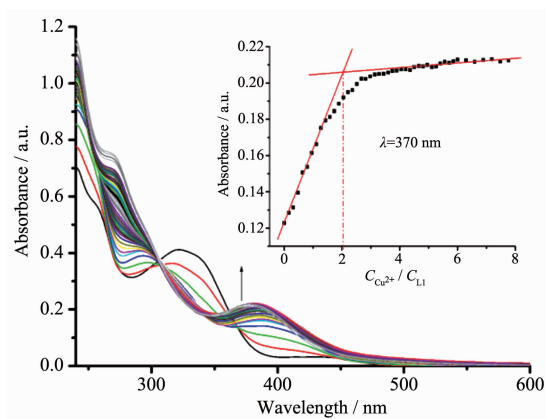


图2 Cu^{2+} /Cl-pimp 体系在不同 pH 条件下的物种分布曲线, Cu^{2+} 和 Cl-pimp 的浓度分别为 0.1 和 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig.2 Species distribution as a function of pH for Cu^{2+} /Cl-pimp system, the concentrations of Cu^{2+} and Cl-pimp are 0.1 and 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively



Inset: Cl-pimp ligand and Cu(II) ion form 2:1 complex

图3 在 MOPS 缓冲溶液(含 10% DMSO)铜离子滴定配体 Cl-pimp 的紫外图谱, Cu^{2+} 和 Cl-pimp 的浓度分别为 0.8 和 0.02 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig.3 UV-Vis spectra titrations of Cl-pimp (0.02 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) with Cu^{2+} (0.8 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) used in the study in DMSO-MOPS solution (1:9) at room temperature

4 μL 。如图 3 所示,随着铜离子的加入,在 370 nm 处出现一个新的吸收峰,且该峰的强度随着铜离子浓度的增加逐渐增强,当配体与铜离子的物质的量之比接近 2:1 时,吸收峰的强度几乎不变,根据滴定数据拟合得到配体和铜离子在溶液中的结合比为 2:1,该实验结果与电位滴定结果一致,二者都表明配合物在 pH 为 7.2 的水溶液中容易以配体和铜离子之比为 2:1 的形式存在。

2.2.3 Job's plot 分析

为了进一步证明配体与铜离子的配合比,作者

设计了 Job's plot 实验,即: Cu^{2+} 和 Cl-pimp 在 MOPS 缓冲溶液(含有 10% DMSO, pH=7.2)中,保持体系中铜离子与配体的总浓度为 0.04 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不变,调节铜离子浓度与总浓度的比例,以该比例为横坐标,370 nm 处的紫外吸收强度为纵坐标得到如图 4 所示的曲线,由图可以看出,当铜离子与总浓度比例为 0.32 时,吸光强度最大,表明配体与铜离子的配位比为 2:1。

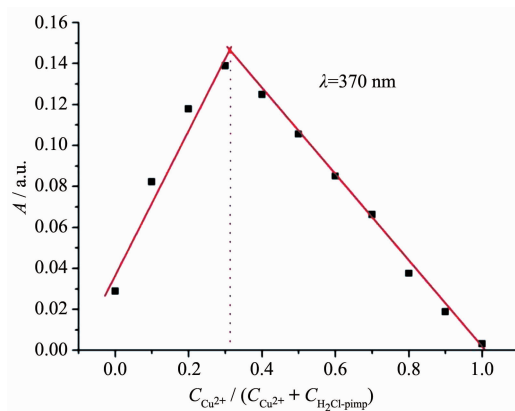


图4 pH 7.2 条件下 Cu^{2+} 和 Cl-pimp 的 Job's plot

Fig.4 Job's plot for determining the stoichiometry of Cl-pimp and Cu^{2+}

3 种溶液分析方法得到一致的结果。

2.3 配合物对 PTPs 活性的抑制作用研究

2.3.1 配合物抑制 PTPs 活性的 IC_{50} 值测定

配合物抑制 PTPs 活性能力强弱的评判标准之一是一半数抑制浓度(IC_{50})的大小。本文分别测定了相同实验条件下 3 个配合物对 4 种 PTPs 活性抑制作用的 IC_{50} 值,结果列于表 2。如表所示,3 个配合物对 PTP1B 和 TCPTP 这两种同源性非常高的酶具有类似的抑制能力, IC_{50} 值约为 0.20~0.31 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,表明 3 个配合物都能够有效抑制这两种酶的活性。与此形成鲜明对照的是,3 个配合物 SHP-1 和 SHP-2 活性的抑制能力要弱得多,其中,对 SHP-1 抑制的 IC_{50} 值大约是 PTP1B 的 10 倍 (IC_{50} 约为 2.7~4.7

表 2 配合物抑制四种 PTPs 活性的 IC_{50} 值(S.D.)

Table 2 IC_{50} (S.D.) of complexes and Cu^{2+} on four PTPs

	$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$			
Complex	PTP1B	TCPTP	SHP-1	SHP-2
[Cu(Cl-pimp) ₂]	0.24(2)	0.23(4)	3.9(9)	>100
[Cu(Br-pimp) ₂]	0.25(4)	0.20(3)	2.7(4)	>100
[Cu(Ac-pimp) ₂]	0.28(5)	0.31(8)	4.7(3)	>100
[Cu(cpmp) ₂] ^[20]	0.46(3)	0.17(1)	0.21(5)	>100

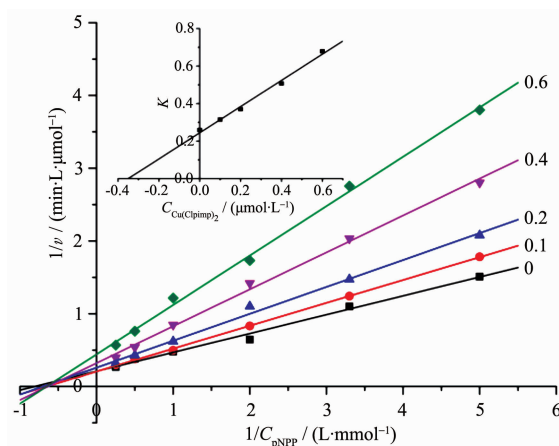
$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),而对 SHP-2 活性几乎没有抑制作用($\text{IC}_{50}>100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。由 IC_{50} 实验的结果可知,本文研究的 3 个配合物可以选择性地抑制 PTP1B 和 TCPTP 两种酶。由于改变配体苯胺环上对位取代基没有明显影响配合物的抑制能力,我们推测 3 种配合物与酶的结合方式类似,且取代基未与酶发生可以改变活性中心结构的显著相互作用,即苯胺对位取代基的改变对配合物抑制 PTPs 酶活性的能力影响比较小。

我们课题组之前曾研究过一个与本文中配合物 $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$ 分子式相同、配位方式相同、但氯原子位于席夫碱酚羟基对位的铜配合物 $[\text{Cu}(\text{cpmp})_2]$ 对 PTPs 酶活性的抑制作用^[20],结果表明该配合物对 PTP1B、TCPTP 和 SHP-1 的活性都有较强的抑制作用(IC_{50} 分别为 0.46 、 0.17 和 $0.21\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),缺乏选择性。而本文工作表明,将席夫碱配体上的氯原子取代位置由酚羟基对位改变为苯胺对位可以显著降低配合物对 SHP-1 活性的抑制能力,同时没有明显改变配合物对 PTP1B 和 TCPTP 这两种同源性很高的酶活性的抑制能力,从而使配合物对 PTPs 的抑制作用有了一定的选择性。通过以上比较分析,我们发现改变席夫碱配体上取代基的位置可以调节配合物对 PTPs 活性抑制作用的选择性。

2.3.2 配合物对 PTP1B 抑制类型及抑制常数的测定

抑制剂与酶相互作用模式的确认对阐明抑制机理非常重要,本文选取抑制作用较强的 PTP1B 酶为代表,通过稳态动力学实验研究了 PTP1B 和配合物 $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$ 之间的相互作用模式。在反应体系中,固定酶溶液浓度,选取 5 个不同的抑制剂 $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$ 浓度 (0 、 0.1 、 0.2 、 0.4 和 $0.6\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 6 个不同的底物 pNPP 浓度 (0.2 、 0.3 、 0.5 、 1.0 、 2.0 和 $4.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),测定在每个抑制剂浓度下,体系初始反应速率随着底物浓度增加的变化值。根据双倒数 $1/v \sim 1/C_S$ 图确定配合物的抑制类型和抑制常数 K_i 值,结果如图 5 所示。由图可知,不同抑制剂浓度的 L-B 方程交于 X 轴负轴上,表明该配合物对 PTP1B 的抑制属于非竞争型抑制,其抑制常数 K_i 为 $0.35\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 2 给出的 IC_{50} 值表明配合物 $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$ 与 $[\text{Cu}(\text{cpmp})_2]$ 对 SHP-1 的抑制能力相差 10 倍,那么它们对 SHP-1 的抑制类型是否有区别呢,为此我们用同样的稳态动力学方法研究了二者对 SHP-1 活性



Inset: determination of K_i for $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$ inhibiting PTP1B

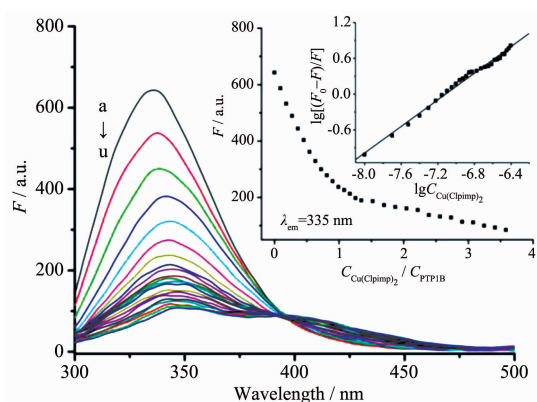
图 5 配合物 $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$ 对 PTP1B 的抑制类型

Fig.5 Lineweaver-Burk plots of $1/v$ vs the reciprocal of the pNPP concentrations at five fixed concentrations of $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$ for PTP1B

的抑制类型,结果表明这两种配合物对 SHP-1 的抑制类型均为非竞争型(图 S3 和 S4,电子支撑材料),我们推测这两种配合物抑制能力的强弱与抑制类型可能没有直接关系,具体的构效关系分析需要在以后工作中继续研究。

2.3.3 荧光光谱法研究配合物与 PTP1B 相互作用

蛋白质具有天然荧光,小分子化合物与其结合容易使蛋白分子的微环境发生变化,从而引起蛋白分子的荧光变化,借助蛋白分子荧光信号的变化能够研究二者之间的相互作用。所以在上述研究的基础上,本文进一步运用荧光光谱法研究了配合物 $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$ 与 PTP1B 之间的相互作用机理,图 6 为配合物对 PTP1B 溶液的荧光猝灭的影响。由图 6 可知,280 nm 的激发波长下,PTP1B 在 335 nm 处有较强的荧光峰,加入配合物之后,在 418 nm 处出现了新的荧光峰。随着配合物浓度的增大,335 nm 处的荧光峰强度不断降低,418 nm 处的荧光峰逐渐增强,直至达到平衡,且图谱在 394 nm 处有等荧光点,这表明配合物 $[\text{Cu}(\text{Cl-pimp})_2]$ 能够与 PTP1B 结合形成复合物。通过荧光猝灭方程的计算分析可知,该配合物与 PTP1B 能够以 1:1 的比例稳定结合(结合常数为 $9.3\times 10^6\ \text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$)。同时稳态动力学实验表明配合物对 PTP1B 活性的抑制为非竞争型,即配合物没有结合在酶的活性中心,因此我们推测配合物在 PTP1B 非活性中心位置的稳定结合间接影响了活性中心的结构,从而抑制了 PTP1B 的活性。



Conditions: λ_{ex} =280 nm, 37 °C, the concentrations of PTP1B and $[Cu(Cl-pimp)_2]$ (a~u) are 0.11 and 0~0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; Inset: Plot for the binding constant (K) and stoichiometry (n) determination

图6 配合物滴定 PTP1B 溶液的荧光谱图,激发波长为 280 nm,温度为 37℃,PTP1B 和滴加配合物 $[Cu(Cl-pimp)_2]$ (a~u) 的浓度分别为 0.11 and 0~0.4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig.6 Fluorescence emission spectra of the titration of PTP1B with $[Cu(Cl-pimp)_2]$

3 结 论

本文研究表明席夫碱铜配合物 $[Cu(Cl-pimp)_2]$ 在溶液中以配体与金属离子物质的量之比为 2:1 的形式稳定存在,而且在 pH=7.2 的缓冲溶液中,配合物的活性物种主要是 $[Cu(Cl-pimp)_2H_2]^{+}$ 。该配合物及另外 2 个配合物 $[Cu(Br-pimp)_2]$ 与 $[Cu(Ac-pimp)_2]$ 对 PTP1B 和 TCPTP 这两种同源性很高的酶活性都表现出较强的抑制能力,但是对 SHP-1 的抑制能力都较弱,而对 SHP-2 都几乎没有抑制作用。这表明席夫碱配体上苯胺对位取代基的改变对其抑制 PTPs 活性的能力没有显著影响。然而,比较 $[Cu(Cl-pimp)_2]$ 与本课题组之前研究过的铜配合物 $[Cu(cmp)_2]$ 的结构及其对 PTPs 活性的抑制能力,我们发现氯原子取代位置由酚羟基对位变为苯胺对位,能够使配合物对 SHP-1 活性的抑制能力显著降低,从而使其对 PTPs 活性的抑制具有一定的选择性。进一步的研究表明, $[Cu(Cl-pimp)_2]$ 对 PTP1B 活性的抑制是非竞争型的,配合物能以 1:1 的比例与 PTP1B 非活性中心区域稳定结合。我们推测这种结合间接影响了活性中心的结构,从而抑制了 PTP1B 的活性。本文研究结果表明改变席夫碱配体上取代基的位置可以调节配合物对 PTPs 活性抑制作用的选择性, 这为设计高效和特异性的 PTPs 活性金属配合物抑制剂

提供了一种可能的方法。

致谢: 非常感谢吉林大学生命科学院 Edmond H. Fischer 信号传导实验室付学奇教授给我们提供了酶的重组表达质粒菌株。

参考文献:

- [1] Daniel K G, Gupta P, Harach R H, et al. *Biochem. Pharmacol.*, **2004**,**67**:1139-2251
- [2] Tonks N K. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2006**,**7**:833-846
- [3] Hendriks W J, Elson A, Harroch S, et al. *FEBS J.*, **2013**, **280**:708-730
- [4] Stuibler M, Doody K M, Tremblay M L. *Cancer Metastasis Rev.*, **2008**,**27**:215-230
- [5] Jiang Z X, Zhang Z Y. *Cancer Metastasis Rev.*, **2008**,**27**:263-272
- [6] Lu L P, Zhu M L. *Antioxid. Redox Signaling*, **2014**,**20**:2210-2224
- [7] LI Peng-Yu(李鹏宇), LU Li-Ping(卢丽萍). *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2013**,**29**(9):1830-1834
- [8] Forte G, Bocca B, Peruzzo A, et al. *Biol. Trace Elem. Res.*, **2013**,**156**:79-90
- [9] Majumder S, Chatterjee S, Pal S, et al. *Biometals*, **2009**,**22**: 377-384
- [10] Vanko J, Marek J, Travnicek Z, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2008**,**102**:595-605
- [11] Qazzaz M, Abdul-Ghani R, Metani M, et al. *Biol. Trace Elem. Res.*, **2013**,**154**:88-96
- [12] YE Xing-Pei(叶行培), WANG Guan-Jie(王冠杰), PAN Peng (潘鹏), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2014**, **30**(12):2789-2795
- [13] MA Zheng-Ping(马正平), CHEN Qiu-Yun(陈秋云), FENG Ru(封如). *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2012**, **28**(11):2395-1400
- [14] Yuan C X, Zhu M L, Wang Q M, et al. *Chem. Commun.*, **2012**,**48**:1153-1155
- [15] Wang Q M, Lu L P, Yuan C X, et al. *Chem. Commun.*, **2010**,**46**:3547-3549
- [16] Wang Q M, Zhu M L, Lu L P, et al. *Dalton Trans.*, **2011**,**40**: 12926-12934
- [17] Ma L, Lu L P, Zhu M L, et al. *Dalton Trans.*, **2011**,**40**:6532-6540
- [18] Ma L, Lu L P, Zhu M L, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2011**,**105**: 1138-1147
- [19] Li Y, Lu L P, Zhu M L, et al. *Biometals*, **2011**,**24**:993-1004

- [20]Zhu R T, Lu L P, Zhu M L. *Inorg. Chim. Acta*, **2013**,**405**: 91-97
- [21]Yuan C X, Lu L P, Gao X L, et al. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2009**,**14**:841-851
- [22]GAO Xiao-Li(高晓丽), LU Li-Ping(卢丽萍), ZHU Miao-Li(朱苗力), et al. *Acta Chim. Sinica*(化学学报), **2009**,**9**:929-936
- [23]Zhu Z, Sun M, Zhang X, et al. *Chem. Res. Chin. Univ.*, **2007**, **23**:289-296
- [24]Li W N, Zhuang Y, Li H, et al. *Chem. Res. Chin. Univ.*, **2008**,**24**:592-596
- [25]MIAO Qiu-Li(苗秋丽). *Thesis for the Master of Jilin University* (吉林大学硕士论文). **2010**.
- [26]Han H, Lu L P, Wang Q M, et al. *Dalton Trans.*, **2012**,**41**: 11116-11124
- [27]Han Q F, Jian F F, Lu L D, et al. *J. Chem. Crystal*, **2001**,**31** (5):247-250
- [28]Yuan C X, Lu L P, Wu Y B, et al. *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, **104**:978-986
- [29]Gans P, Vacca A, Sabatini A. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1985**:1195-1200
- [30]Woolley E M, Tomkins J, Hepler L G. *J. Solution Chem.*, **1972**,**1**:341-351
- [31]Takács-Novák K, Box K J, Avdeef A. *Int. J. Pharm.*, **1997**, **151**:235-248
- [32]Ember B, Kamenecka T, LoGrasso P. *Biochemistry*, **2008**, **47**:3076-3084
- [33]Mondal S, Rath S P, Rajak K K, et al. *Inorg. Chem.*, **1998**, **37**:1713-1719
- [34]CHEN Zhan-Fen(陈战芬), MA Yi-Dan(马艺丹), HUA Luo-Guang(华罗光), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2014**,**30**(7):1525-1534
- [35]Ding F, Zhao G Y, Huang J L, et al. *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**,**44**:4083-4089
- [36]Wang H Y, Zhang M, Lü Q L, et al. *Spectrochim. Acta Part A*, **2009**,**73**:682-686